

MMP-8 Is Involved in Formation of the Rat Periodontium during Tooth Eruption

著者	坪田 真
号	27
学位授与番号	215
URL	http://hdl.handle.net/10097/36354

氏 名 (本籍)	坪 田 真 ^{つば た まこと}
学 位 の 種 類	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	歯 博 第 2 1 5 号
学位授与年月日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	東北大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯 学 臨 床 系
学 位 論 文 題 目	MMP-8 Is Involved in Formation of the Rat Periodontium during Tooth Eruption (MMP-8 はラットの歯の萌出に伴う歯周組織の形成に関与する)

(主査)

論文審査委員	教授 島 内 英 俊	教授 加賀山 学
		教授 高 田 春比古

論文内容要旨

歯の萌出に伴い、歯周組織は広範に改変されるが、その機序に関する知見は乏しい。コラーゲンは、歯槽骨、歯根膜及びセメント質の骨組みをつくる主要な細胞外基質分子である。本研究ではコラーゲン分解酵素 (collagenase) が歯周組織の改変に関与するとの仮説を立て、ラット臼歯の萌出過程における matrix metalloproteinase (MMP) 8 と MMP13 の遺伝子発現を検討した。また、コラーゲンを産生する細胞を同定するため、I 型コラーゲンと III 型コラーゲンの遺伝子発現を併せて検索した。実験には第一臼歯萌出期にある生後 2, 3, 4 週齢及び萌出完了期の 6 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。ラットに灌流固定を施し、上顎の歯周組織を含む部位を摘出して EDTA で脱灰した後、通法に従ってパラフィンに包埋し、連続切片を作製した。第一に、連続切片の一部を proteinase K と DNase で処理後、臼歯の歯周組織部位を切り出して逆転写を施し、得られた DNA を増幅して (Section-RT-PCR)、歯の萌出過程における MMP8 と MMP13 の遺伝子発現を検討した。第二に、残りの連続切片に in situ hybridization を施し、Section-RT-PCR で検出された遺伝子発現の組織上での局在を検索した。Section-RT-PCR では、歯の萌出過程の歯周組織で MMP8 と MMP13 の遺伝子発現が認められた。また、in situ hybridization では、MMP8 の発現が歯根膜細胞、セメント芽細胞、セメント細胞、歯槽骨の骨芽細胞、骨細胞に広く見られるのに対して、MMP13 の発現は骨芽細胞と骨細胞に限局することが明らかとなった。一方、コラーゲンの遺伝子は歯周組織の細胞で広く発現していたが、I 型コラーゲンは特に歯根膜細胞と骨芽細胞で、また、III 型コラーゲンは歯根膜細胞で強く発現していた。本研究の結果、歯の萌出過程で MMP8 が歯周組織の改変に関与することが示唆され、また歯根膜細胞等の歯周組織を構成する細胞がコラーゲン基質の産生と分解の両面で重要な役割を担う可能性が示された。

審 査 結 果 要 旨

歯周組織は、歯の萌出や移動に伴い常に改変を受けている。歯周組織の改変に当たっては、まずその構造を作っている細胞外マトリックスが分解されることが不可欠と考えられるが、そのメカニズムの詳細は未だ不明である。申請者の坪田 真君は、歯根膜、セメント質および歯槽骨の主要な細胞外マトリックスを構成している分子がコラーゲンであることに着目し、それを分解する酵素(コラゲナーゼ)が歯周組織の改変に関わるとの仮説のもとに研究を遂行した。

本研究ではラットを用いて、臼歯の萌出に伴う歯周組織の改変過程におけるコラゲナーゼの遺伝子発現を検討した。ラットのコラゲナーゼとしては、matrix metalloproteinase(MMP) 8 と 13 の 2 種類が報告されていることから、これらの遺伝子発現を RT-PCR と in situ hybridization で検索した。また、コラーゲンを産生する細胞を同定する目的で I 型コラーゲンと III 型コラーゲンに対する in situ hybridization も併せて行った。

本研究で得られた成果でまず特筆すべきは、組織切片から特定の細胞集団を採取し、RT-PCR で遺伝子発現を解析する方法を開発したことである。従来、歯や骨等の硬組織の細胞から RNA を抽出し遺伝子発現を検討するためには、硬い組織を粉碎し細胞を回収する複雑な操作が必要であった。坪田君は、RNA の保存に配慮した化学固定と脱灰を硬組織に施した後、包埋して切片とし、実体顕微鏡等により特定の部位の細胞集団を同定した上で採取し、RT-PCR を行い遺伝子発現を解析する方法を開発することに成功した。本法は in vivo の硬組織細胞の遺伝子発現解析を行う上で画期的な研究方法となると期待される。

さらに本研究の結果、1) 従来好中球に固有のコラゲナーゼと考えられていた MMP8 が歯根膜細胞、セメント芽細胞、セメント細胞、骨芽細胞、骨細胞等に広く発現する、2) 従来ラットやマウスの結合組織の分解に関わると考えられていた MMP13 が歯根膜細胞ではほとんど発現せず、発現が一部の骨芽細胞と骨細胞に限られていることが明らかとなった。これらの知見から、著者は歯周組織を構成する細胞がコラーゲンの産生と分解の両面で重要な役割を担うことにより同組織の改変に関与する可能性を示している。

本論文で示された実験成績はいずれも明確なものであり、さらに坪田君は新たに開発した研究方法を用いて得られた画期的な新知見に基づき、生物学的にも、また臨床歯科医学的にも意義深く発展的な考察を行っている。

以上示したとおり、坪田君の論文は、歯周病等、歯周組織の破壊を伴う疾患の病態を解明する上でも有用な情報を提供するものと考えられる。従って、当審査委員会は本論文を博士(歯学)の学位を授与するに相応しいものと判定した。